

第三節 プロテアーゼ阻害蛋白質 (SSI) をコードする *sgiA* の取得と解析

2.1.3-I 背景と目的

sprT、*sprU* の機能については、遺伝子破壊により解析を行ったが、二次代謝、形態分化ともに変化はみられなかった。また、同じように *AdpA* の標的遺伝子として同定されたキモトリプシン型分泌プロテアーゼをコードする *sprA*、*sprB*、*sprD* についても遺伝子破壊で形態分化に関する形質は観察されていない。一方、放線菌は多数の分泌プロテアーゼを生産することが知られており、単一、もしくは数種のプロテアーゼの欠損では他のプロテアーゼによりその形質は隠されてしまっていることも考えられた。プログラム細胞死の1つと称される *Bacillus subtilis* の孢子形成において、母細胞を溶解するオートライシン遺伝子群 (*cwl*) では、1つの遺伝子破壊では形質の変化は見られず、2つの遺伝子破壊ではじめて母細胞の溶解が観察されなくなる、という報告もある (Lewis *et al.*, 2000)。そこで、今度は放線菌自身が生産する分泌型プロテアーゼ阻害蛋白質、SSI ファミリー蛋白質に注目した。SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) は *Streptomyces albogriseolus* S-3253 から最初に発見された、染色体にコードされるプロテアーゼ阻害蛋白質である (Murao *et al.*, 1972; Obata *et al.*, 1989)。SSIはダイマーを形成し、アルカリ性セリンプロテアーゼを強く阻害する。SSI 様蛋白質 (SIL、SSI-like protease inhibitors) は様々な *Streptomyces* から発見されており、SSI ファミリーを形成している (Taguchi *et al.*, 1994; Taguchi, 1995b; Taguchi *et al.*, 1997)。 *Streptomyces* 属に広く保存されている蛋白質であることから、その生理的機能には何らかの重要性があると推測される。

阻害蛋白質は標的となる多数の分泌型プロテアーゼの活性を抑制するため、阻害蛋白質の欠損株、または過剰発現株は分泌プロテアーゼに関係する形質が強く表れることが予想される。本節では、阻害蛋白質の発現解析とともにこれらの株の作製・解析を行うことによって分泌プロテアーゼの機能を調べることを目的としている。このアプローチはまず、研究開始当初に全ゲノム情報が明らかになっており、SSI ファミリー蛋白質をコードする遺伝子をデータベースから取得することができた *S. coelicolor* A3(2)を用いて行った。本研究の流れからすれば最初から *S. griseus* で SSI ファミリー蛋白質の解析を行うのが自然な流れであるが、*S. griseus* で解析を行うのは困難な点があり (後述)、先に *S. coelicolor* A3(2)を用いて行った。その後、醗酵学研究室独自に推進された *S. griseus* のゲノム解析も進み、このゲノム情報を利用することで *S. griseus* でも研究を開始した。最初に 2.1.3a の項で *S. coelicolor* A3(2)について、次に 2.1.3b の項で *S. griseus* について述べる。

2.1.3a *S. coelicolor* A3(2)における SSI 遺伝子の解析

2.1.3a-II 結果

S. coelicolor A3(2)のゲノムデータベースを利用した SSI ホモログの探索

S. coelicolor A3(2)の全ゲノムは 2002 年に解読終了が報告された (Bentley *et al.*, 2002)。*S. coelicolor* A3(2)は *Streptomyces* でも最も遺伝学的研究が進んでいる種であり、この報告は *Streptomyces* ゲノム解読の初めての例であった。このゲノムデータベースを利用し、SSI と相同性を持つ蛋白質を探索すると、SCO0762 と SCO4010 の 2 つの SSI ホモログが見いだされた。これらはそれぞれ、SCO0762 が SSI と 70%、SCO4010 は 43%の相同性を示すものであった。

SCO0762 については、生化学的解析により *S. coelicolor* Müller ISP5233 株から SIL-3 と命名された SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質が精製されていた (Taguchi *et al.*, 1994) が、SCO0762 は SIL-3 と 3 アミノ酸異なるのみでそれ以外のアミノ酸配列は一致していた。この違いは、SCO0762 の 78 番目のアラニンが SIL-3 ではアスパラギン酸、97 番目のグルタミン酸がアスパラギン酸、99 番目のセリンがアラニン、というようなアミノ酸置換であったが、阻害活性に影響するものではなかった。したがって、SCO0762 と SIL-3 は *S. coelicolor* に共通した SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質であり、アミノ酸の違いは株の違いによるものであると考えられる。図 2.1.3a-1 に SSI、SCO0762、SCO4010 のアミノ酸アラインメントを示した。SSI は分泌蛋白質であり N 末に pre-pro 配列を持つが、培養液から精製された SSI の N 末端は 32 番目のアスパラギン酸であったことからこの残基が成熟蛋白質の開始部位と考えられる。また、Signal P プログラムにより予測された SSI のシグナルペプチダーゼによる切断部位は 28 番目のアラニンと 29 番目のアラニンの間であり、ここが pre 配列と pro 配列の境界にあたる考えられた。SCO0762 については、成熟体は SIL-3 と同じ 38 番目のチロシンからであり、pre 配列と pro 配列の境界は Signal P プログラムから 35 番目のアラニンと 36 番目のセリンの間であると考えられた。なお、構造維持によって SSI の活性に寄与する、ジスルフィド結合を形成する 102 番目と 132 番目のシステイン、C 末端と塩橋を形成する 60 番目のアルギニンは SCO0762 で保存されていた。

SCO4010 については、上で述べたように SSI との相同性は低かった。さらに、ジスルフィド結合を形成する 102 番目と 132 番目のシステインは保存されていたものの、C 末端との塩橋形成に必要な 60 番目のアルギニンはグリシンに置換されていた。これらの高次構造維持のための残基は単に蛋白質の構造維持というだけでなく、SSI 自身がプロテアーゼによって分解されることなく耐性を維持しつつ、プロテアーゼ活性の阻害を行うという SSI ならではの役割もあり、活性に必須である。このことから、SCO4010 はプロテアーゼ阻害活性を示さないか、または非常に微弱であることが予想された。図 2.1.3a-2 に SCO0762 と SCO4010 周辺の遺伝子構成を示す。

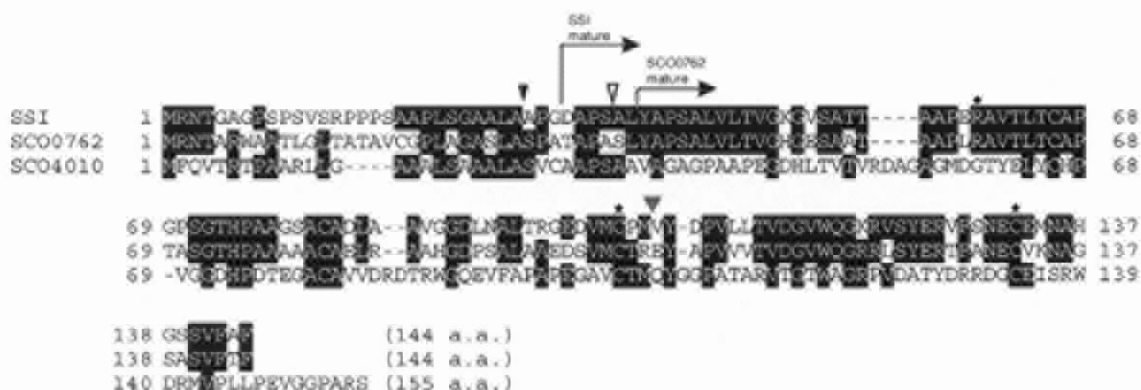


図 2.1.3a-1 *S. coelicolor* A3(2)における SSI 様蛋白質のアミノ酸アラインメント

SSI (*S. albogriseolus* S-3253 由来) と *S. coelicolor* A3(2)ゲノム情報から見いだされた SSI 様蛋白質 SCO0762 および SCO4010 のアミノ酸配列を比較した。●は C 末端との塩橋形成による構造維持に必要とされるアルギニン残基を示す。★はジスルフィド結合により構造を維持するのに必要なシステイン残基を示す。SSI および SCO0762 の成熟型 (mature) 配列の N 末端は矢印で示した (SCO0762 については SIL-3 を参考にした)。▼で反応部位を示した。反応部位周辺のアミノ酸配列には多様性がある (Taguchi, 1995b)。Signal P プログラムにより予測された SSI および SCO0762 の pre-pro 配列の境界をそれぞれ▼および▽で示した。

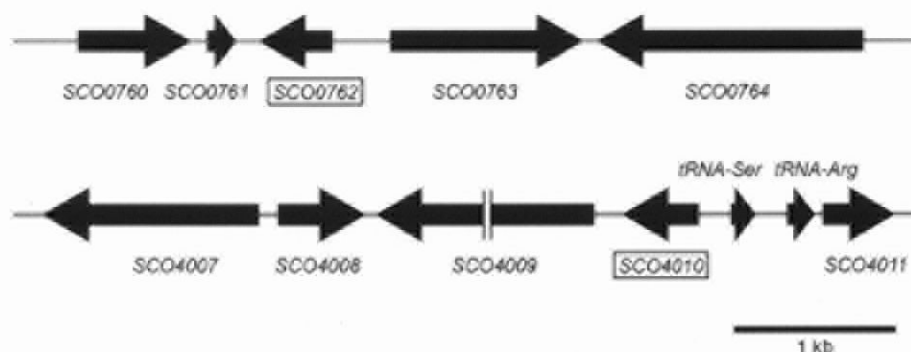


図 2.1.3a-2 *SCO0762* および *SCO4010* 周辺の遺伝子構成

周辺の遺伝子の位置と方向を矢印で示した。周辺の ORF とのホモロジーは、SCO0760 : methyltransferase、SCO0761 : unknown protein、SCO0763 : oxidoreductase、SCO0764 : hydrolase、SCO4007 : integral membrane protein、SCO4008 : TetR family regulatory protein、SCO4009 : bifunctional protein、SCO4011 : integral membrane protein である。

SCO0762 および SCO4010 の転写解析

以上により、SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質として SCO0762 と SCO4010 をゲノムデータベースから見いだしたが、実際生体内で発現しているか否かは不明である。そこで転写を調べることによりこれらの蛋白質をコードする遺伝子の発現を調べた (図 2.1.3a-3)。醗酵学研究室で標準的な株として用いている *S. coelicolor* A3(2) の M130 株をプレート培地で培養し、24 時間 (基底菌糸)、48 時間 (基底菌糸および気中菌糸)、72 時間 (気中菌糸および孢子) 培養菌体から RNA を抽出して S1 マッピング法により転写解析を行った。その結果、SCO0762 は培養を通じて非常に強い転写を示したが、SCO4010 は 24 時間では転写が見られず、48 時間以降で弱い転写を示した。

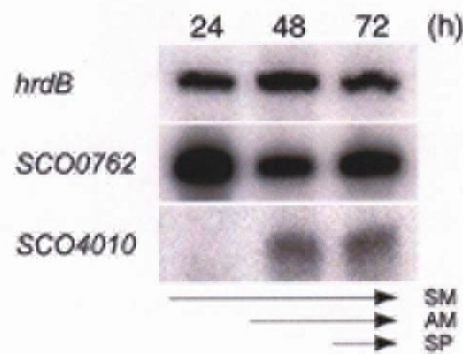


図 2.1.3a-3 S1 マッピング法による SCO0762 および SCO4010 の転写解析

S. coelicolor A3(2) M130 を TSB 固体培地上において 30°C で培養した。培養 24、48、72 時間で菌体を回収した。*hrdB* は恒常的に発現するシグマ因子で RNA 量のコントロールである。

SM: 基底菌糸、AM: 気中菌糸、SP: 孢子、を示す。

SCO0762 については高解像度の S1 マッピング法により転写開始点を決定し、翻訳開始点より 64 bp 上流の G であることが判明した (図 2.1.3a-4)。プロモーターを調べると、-35 および -10 領域が通常のスパーサー長である 17 bp の間隔で見られた。SCO4010 については後述の遺伝子破壊解析により偽遺伝子であることが予想されたので転写開始点は決定していない。

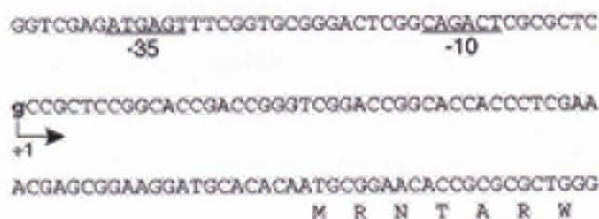
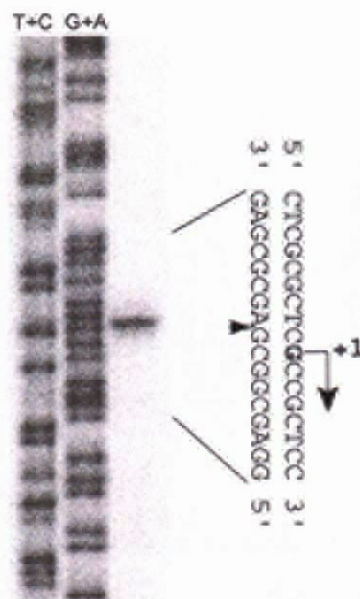


図 2.1.3a-4 高解像度 S1 マッピング法による SCO0762 の転写開始点決定

下にプロモーター周辺の塩基配列を示し、転写開始点、-35 および-10 領域、翻訳された N 末領域アミノ酸配列を示した。

SCO0762 および SCO4010 遺伝子破壊株の作製とその形質

SCO0762 および SCO4010 の機能を調べるため、遺伝子破壊株を作製した。SCO0762 は薬剤耐性遺伝子で置換することにより遺伝子破壊を行い、SCO4010 はインフレーム欠失株を作製することによって遺伝子破壊を行った (図 2.1.3a-5 および図 2.1.3a-6)。作製した遺伝子破壊株および M130 株をスキムミルク添加のプレート培地で培養し、スキムミルクが分解して形成したハロを観察することによって分泌プロテアーゼ活性の増減を調べた (図 2.1.3a-7)。すると、SCO0762 破壊株 (Δ SCO0762 株) では大きなハロの形成が見られたが、M130 株および SCO4010 破壊株 (Δ SCO4010 株) は 72 時間たってもハロが見られるほどの分泌プロテアーゼ活性は見られなかった。このことは、SCO4010 では構造維持に必要な残基が保存されていないなかったこと、および転写量が非常に少なかったことに由来すると考えられる。SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質として主要なものは SCO0762 であり、SCO4010 は少なくとも生体内で SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質としての働きはほぼないに等しいと結論づけた。

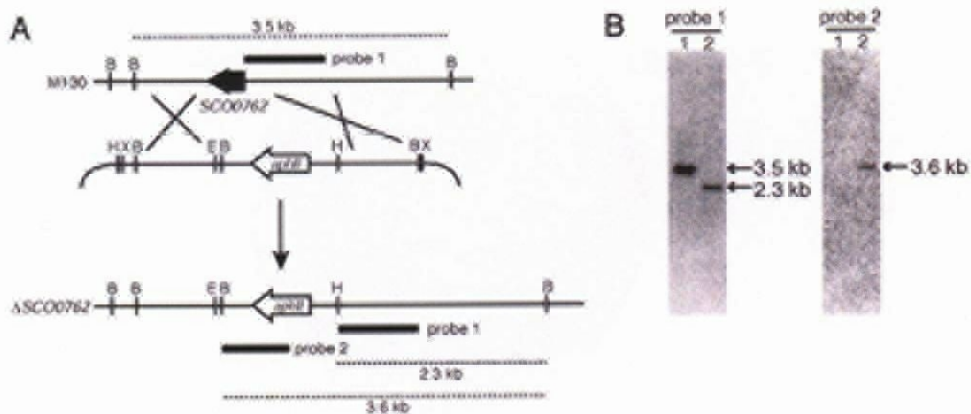


図 2.1.3a-5 *SCO0762* 遺伝子破壊株の作製

(A) *SCO0762* 遺伝子破壊のスキーム。B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; X, *Xba*I の制限酵素サイトを示す。(B) サザンハイブリダイゼーションによる遺伝子破壊の確認。*Bam*HI-*Hind*III 処理した染色体に対して probe 1、*Bam*HI 処理した染色体に対して probe 2 を用いた。レーン 1: M130 株、レーン 2: *SCO0762* 遺伝子破壊株

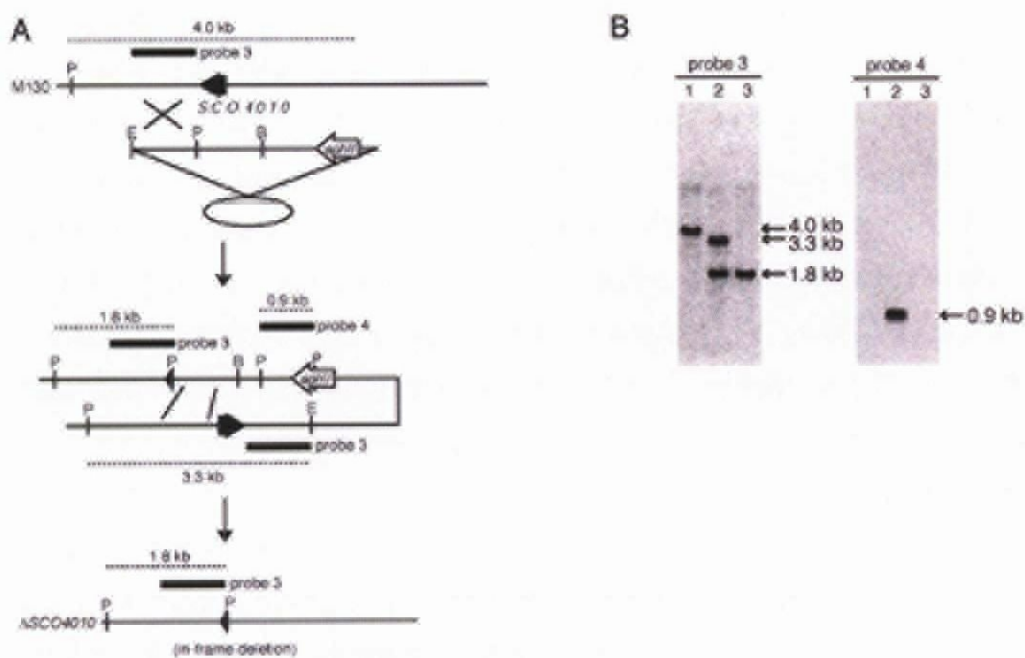


図 2.1.3a-6 *SCO4010* 遺伝子破壊株の作製

(A) *SCO4010* 遺伝子破壊のスキーム。B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; P, *Pst*I の制限酵素サイトを示す。(B) サザンハイブリダイゼーションによる遺伝子破壊の確認。*Eco*RI-*Pst*I 処理した染色体に対して probe 3、probe 4 を用いた。レーン 1: M130 株、レーン 2: 1 回組みかえ体、レーン 3: *SCO4010* 遺伝子破壊株



図 2.1.3a-7 スキムミルクプレートによるプロテアーゼアッセイ

Bennett 培地にスキムミルクを 0.7% 添加した固体培地上で 30°C、48 時間培養し、撮影した。プロテアーゼ活性をスキムミルクの分解によりできるハロによって検出した。

さらに、M130 株と ΔSCO0762 株の分泌プロテアーゼ活性を合成基質により測定し比較した。転写解析を行なった際と同様に M130 株と ΔSCO0762 株を培養し、菌体を除いた後プレートから蛋白質を抽出してそのプロテアーゼ活性を測定した。合成基質はキモトリブシンにより分解される *N*-succinyl-ala-ala-pro-phe-*p*-nitroanilide (AAPF) とトリブシンにより分解される *N*-benzoylarginine *p*-nitroanilide (BAPNA) を用いた。キモトリブシン活性、トリブシン活性ともに ΔSCO0762 株では定常期に入ると顕著に上昇したが、親株の M130 株では培養後期になっても活性の上昇は見られなかった (図 2.1.3a-8)。同時に生育を調べると、全体として ΔSCO0762 株の菌体量が多かったが、これは ΔSCO0762 株では分泌プロテアーゼ活性が上昇しているためにより栄養を取り込みやすくなった結果と考えられる。トリブシンおよびキモトリブシン活性は培養後期で上昇しているが、スキムミルクプレートを用いたアッセイでは栄養増殖の時期にもかなり分泌プロテアーゼ活性の増加が見られていることから矛盾しない。また、液体培養した際にもこの生育の差は見られた。なお、過剰発現の項でも触れるが、SCO0762 のプラスミドを用いた発現はうまく機能せず、相補実験はできなかった。

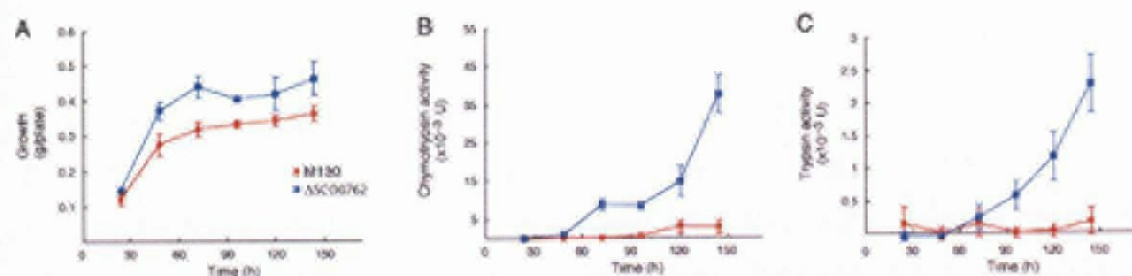


図 2.1.3a-8 合成基質によるプロテアーゼ活性測定

TSB 固体培地において 30°C で培養し、培地中のプロテアーゼ活性を合成基質を用いて測定した。(A)生育。(B)キモトリプシン活性。(C)トリプシン活性。材料と方法を参照。

形態分化については、TSB 培地、R2YE、Bennett 培地の炭素源を種々変えたもの、最少培地の炭素源を種々変えたもの、といった *S. coelicolor* A3(2) で用いられる様々な培地で M130 株および ΔSCO0762 株、ΔSCO4010 株のそれぞれを培養して観察した。しかしながら、形態分化のタイミングや形成した気中菌糸・胞子の状態に差は見られなかった。

SCO0762 過剰発現株の作製

遺伝子破壊とは逆に、SCO0762 を過剰発現することで分泌プロテアーゼ活性を抑えた場合の形態分化への影響を調べた。SCO0762 を自身のプロモーター、*hrdB* プロモーター、*melC* プロモーターにつなぎ、低コピーベクターおよび高コピーベクターに組み込むことで様々なタイミング、発現量で SCO0762 が発現するプラスミドを構築した (data not shown)。これらを M130 株に形質転換し、SCO0762 が発現しプロテアーゼ阻害活性を発揮しているかをスキムミルク入りのプレート培地で調べた。しかし、いずれの場合も分泌プロテアーゼ活性に差は見られず、何らかの原因によって発現が阻害されていた。転写レベルでの阻害も考えられるが、SCO0762 は分泌・プロセッシングを経て活性体になる蛋白質なので、コピー数が変わると翻訳後の分泌・プロセッシングに問題が生じるのではないかと考えている。

2.1.3a-III 討論

S. griseus において形態分化を制御する A-ファクターにより複数の分泌プロテアーゼが発現制御されることがわかり、その生理的機能として菌糸分解を介した形態分化への寄与が考えられたことに端を発した研究であった。また、*S. albogriseolus* で取得された SSI 欠失変異株は形態分化能を失っていたことから、分泌プロテアーゼの制御と形態分化には何らかの関係があると考えられた (Taguchi *et al.*, 1995a)。菌糸分解を介した形態分化への寄与は *Streptomyces* 全般に見られるものであると考え、また染色体上にコードされる全ての SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質について調べることができたのは当時 *S. coelicolor* A3(2)のみであったため、*S. coelicolor* A3(2)を用いてこの研究を開始した。*S. coelicolor* A3(2)は 2 つの SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質を持ち、SCO0762 が強く発現しプロテアーゼ活性を抑制しており、SCO4010 は発現が弱くアミノ酸の保存性からも偽遺伝子であると予想された。この遺伝子の破壊、または過剰発現によって形態分化に何らかの影響が見られることを期待していたが、行った限りの実験ではそのような影響を見いだすことはできなかった。そもそも *S. coelicolor* A3(2)において分泌プロテアーゼは形態分化に強い寄与は持っていないのかもしれない。しかし一方、分泌型のトリプシンおよびキモトリプシン活性を調べた結果、 Δ SCO0762 株でも栄養増殖を終えた定常期以降で活性が上昇していた。分泌プロテアーゼは一般に菌の周囲の栄養分を分解し、栄養摂取・増殖を行うために利用されているが、すでに周囲の栄養はほとんど使い果たしたと考えられる定常期以降での活性上昇はこれと矛盾する。また、M130 株ではこれらのプロテアーゼ活性は栄養増殖期のプロテアーゼ活性とともに SCO0762 蛋白質によって低く抑えられたままであり、自身が生産する分泌プロテアーゼと阻害蛋白質の制御関係は何らかの生理的な重要性を示す、興味深いものであった。実験室で行っている培養条件等や我々が用いている観察方法では見いだせないような形質を示しているのかもしれないが、現在のところその意義は不明である。

2.1.3a-IV 材料と方法

菌株及び培地組成

[菌株]

Streptomyces coelicolor A3(2) M130 株：*Streptomyces coelicolor* A3(2)の標準株として用いている株。

[培地]

TSB 培地：トリプトソーヤブイヨン（ニッスイ）を添付の記載に従い蒸留水にとかしたのもの。その他、*Streptomyces coelicolor* A3(2)培養のための各種培地は Hopwood らのマニュアル (Kieser *et al.*, 2000) によった。

S1 マッピング法による転写解析

TSB 液体培地で 3 日間前培養した菌体を新鮮な TSB 培地で洗い、ホモジナイズした菌体をセロハンをひいた TSB 固体培地に植菌し本培養・菌体回収した。RNA 抽出は RNAqueous-Midi (Ambion) を用いて行った（菌体破碎をソニケーションを用いて行った以外は添付説明書にそって行った）。S1 マッピング法は前章までと同じ方法である。*hrdB* の転写は *hrdBc-F* (5'-GGCCGCAAGGTACGAGTTGATGACCTTGTATTATCC-3', -279 to -243) と *hrdBc-R** (5'-AGGCCCCGACGCACGTCATCGCCGGCGATCTGCCCC-3', +121 to +87) のプライマーの組み合わせ (*のプライマーを ³²P ラベルした) による PCR を用いて作製したプローブを用いて検出した。*SCO0762* の転写は *SCO0762-F* (5'-CACCATACCCGCGAGTATGC-3', -256 to -237) と *SCO0762-R** (5'-TGGCCGTCAGGCCCAGAGTCGCTGCCCAGC-3', +110 to +91) のプライマーの組み合わせによるプローブを用い、高解像度 S1 マッピング法では *SCO0762-R** のかわりに *SCO0762-RH** (5'-CCGCATTGTGTGCATCCTTC-3', +70 to +51) を用いた。*SCO4010* の転写は *SCO4010-F* (5'-GGGGCTTCCGTGTTTCGTGCGGAGGCGGAGG-3', -290 to -271、ただし *SCO4010* の転写開始点は決定していないので、開始コドン+1としている) と *SCO4010-R** (5'-CAGACGGAGGCGAGGGCGGCGGCGGACAGG-3', +80 to +61) のプライマーの組み合わせを用いて作製したプローブを用いて検出した。

SCO0762 遺伝子破壊株の作製

薬剤耐性遺伝子の挿入により遺伝子破壊を行った。図 2.1.3a-5 も参照。この遺伝子破壊により *SCO0762* 全 144 アミノ酸中、Met-1 から Phe-142 にあたる塩基配列がカナマイシン耐性遺伝子に置換された。破壊用プラスミドの構築について以下に記す。

まず、SCO0762 上流および下流それぞれ約 1 kb の DNA 断片を PCR によって取得した。プライマー dSSI-RR (5'-CGCGGATCCAGAAGTAGTTGGCGGTGCCG-3'、下線は *Bam*HI 制限酵素サイトを示す) と dSSI-RF (5'-CCCAAGCTTTGTGTGCATCCTTCCGCTCG-3'、下線は *Hind*III 制限酵素サイトを示す) を用いて *S. coelicolor* A3(2) M130 の染色体を鋳型として行った PCR により SCO0762 の上流 DNA 配列を増幅し、pUC19 の *Bam*HI-*Hind*III サイトにクローニングした。DNA シークエンスにより PCR エラーがないことを確認した。同様に SCO0762 下流 DNA 配列をプライマー dSSI-LR (5'-CGGAATTCACGTTCTGAGGGACCGGGAC-3'、下線は *Eco*RI の制限酵素サイトを示す) と dSSI-LF (5'-GCTCTAGATCATGGTGCTACCGGGCGTC-3'、下線は *Xba*I の制限酵素サイトを示す) を用いて PCR により増幅し、pUC19 の *Eco*RI-*Xba*I サイトにクローニングした。上流 *Bam*HI-*Hind*III 断片と Tn5 から *Eco*RI-*Hind*III で切り出したカナマイシン耐性遺伝子断片をつなげ pUC19 の *Bam*HI-*Eco*RI サイトへ 3 断片ライゲーションを行った。得られたプラスミドから上流配列とカナマイシン耐性遺伝子をつなげた断片を *Eco*RI-*Xba*I (マルチクローニングサイト) で切り出すことで得、SCO0762 の下流配列をのせたプラスミドから *Eco*RI-*Hind*III (マルチクローニングサイト) で切り出した断片と pUC19 の *Xba*I-*Hind*III サイトへ 3 断片ライゲーションし、破壊用プラスミドとした。

このプラスミドを *E. coli* JM110 株により大量調製し、*Dra*I で切断して線状にした後、0.1 M NaOH でアルカリ変性-中和を施し、*S. coelicolor* A3(2) M130 に形質転換した。破壊株は染色体を抽出してサザンハイブリダイゼーションを行うことで確認した。

SCO4010 遺伝子破壊株の作製

SCO4010 遺伝子破壊についてはインフレーム欠失の方法をとった。図 2.1.3a-6 も参照。SCO4010 蛋白質全 155 アミノ酸中、Phe-2 から Ser-155 にあたる塩基配列を *Pst*I サイトに置換することにより、インフレームで欠失させた。破壊用プラスミドの構築について以下に記す。

SCO4010 上流および下流それぞれ約 1 kb の DNA 断片を PCR によって取得した。プライマー d4010-RR (5'-CGCGGATCCGAAGCGCGACACCTCCGAAC-3'、下線は *Bam*HI 制限酵素サイトを示す) と d4010-RF (5'-AAAAGCTGCAGCATGACCTGACCAACGCGCC-3'、下線は *Pst*I の制限酵素サイトを示す) を用いて、*S. coelicolor* A3(2) M130 の染色体を鋳型として行った PCR により SCO4010 の上流 DNA 配列を増幅し、pUC19 の *Bam*HI-*Pst*I サイトにクローニングした。DNA シークエンスにより PCR エラーがないことを確認した。同様に SCO4010 下流 DNA 配列をプライマー d4010-LR (5'-AAAAGCTGCAGTCGGGCCCGGACGGTCACCG-3'、下線は *Pst*I の制限酵素サイトを示す) と d4010-LF (5'-CCGGAATTCCTCCTCGTGCTCCTCGACG-3'、下線は *Eco*RI の制限酵素サイトを示す) を用いて PCR により増幅し、pUC19 の *Eco*RI-*Pst*I サイトにクローニングした。このようにして得た SCO4010 の上流 *Bam*HI-*Pst*I 断片と下流 *Eco*RI-*Pst*I 断片を切

り出し、*EcoRI*-*Bam*HI で処理した pUC19 と 3 断片ライゲーションを行った。得られたプラスミドの *Bam*HI サイトに Tn5 から切り出したカナマイシン耐性遺伝子を挿入することで破壊用プラスミドとした。

これを *E. coli* JM110 株より大量調製し、アルカリ変性-中和を施して *S. coelicolor* A3(2) M130 に形質転換することで染色体に組み込み、ネオマイシンで選択後、組み換えをサザンハイブリダイゼーションで確認した。得られた株を薬剤なしの培地で数回うえついだ後、胞子を回収してまくことでシングルコロニーを得、薬剤感受性になった株の染色体を用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、プラスミドが抜け落ち *SCO4010* 欠失株となったものを選択・取得した。

プロテアーゼ活性測定

S1 マッピング用 RNA 抽出のための培養と同様、セロハンをひいた TSB 固体培地で培養した。培地からの蛋白抽出およびプロテアーゼ活性測定は第 2 節のトリプシン活性測定と同様に行った。ただし、キモトリプシン活性測定については、キモトリプシンアッセイバッファー (100 mM Tris-HCl(pH8.0), 10 mM CaCl₂)、および基質として 30 mM *N*-succinyl-ala-ala-pro-phe-*p*-nitroanilide (AAPF) を用いた点が異なる。活性の 1 ユニットは 1 分間に 1 μmol の *p*-nitroanilide を生成するのに必要な酵素量とした (Sarath *et al.*, 1989)。

2.1.3b *S. griseus* における SSI 遺伝子 *sgiA* の取得と解析

2.1.3b-II 結果

S. griseus のゲノムデータベースを利用した SSI ホモログの探索

SSI ファミリーは *Streptomyces* に広く存在するプロテアーゼ阻害蛋白質である。しかしながら、全ての *Streptomyces* が生産することが確認されたわけではない。様々な放線菌の培養上清を調べると、プロテアーゼ阻害活性を持つものもあれば持たないものもあった (Taguchi *et al.*, 1993)。 *S. griseus* でも株によって検出される活性は異なっていた。さらに、SSI の DNA プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションでは、 *S. griseus* 2247 株の染色体とはハイブリダイゼーションが見られなかった (Kuramoto *et al.*, 1996)。また実際、 *S. griseus* IFO13350 の SSI 様蛋白質をコードする遺伝子をクローニングするべく、私は SSI ファミリーに保存された領域の DNA プローブを用いたサザンブロットィング、および縮重プライマーを用いた PCR によるクローニングを試みたが、取得することはできなかった。このため、 *S. griseus* IFO13350 には SSI 様蛋白質をコードする遺伝子は存在しないとも考えられた。しかし、SSI 様蛋白質保存された領域では塩基配列レベルでの保存性は低く、またそもそもアミノ酸レベルでも保存された領域はプローブ設計には困難なものであったため、「 *S. griseus* IFO13350 には SSI 様蛋白質はない」と言い切ることはできなかった。

一方、 *S. griseus* IFO13350 の全ゲノム解析は醗酵学研究室で進められて来ており、ほぼ全てのゲノム解読が終了しようとしている。ここで SSI 様蛋白質をコードする遺伝子の探索にゲノム情報を用いることができるようになった。そこで、 *S. griseus* IFO13350 のゲノムデータベースを用いて SSI 様蛋白質の探索を行ったところ、 *S. albogriseolus* S-3253 の SSI と 43%の相同性をもつ蛋白質をコードする ORF を見いだした。この ORF には *sgiA* (*Streptomyces griseus* protease inhibitor A) と命名した。SSI と *SgiA* のアミノ酸アラインメントを図 2.1.3b-1 に示す。*SgiA* は構造維持に必要とされる残基は全て保存されており、Signal P プログラムおよび PSORT プログラムで解析を行うと SSI と同じ位置でプロセッシングを受け、細胞外に分泌される可能性が高いと予想された。以上のことから、 *sgiA* がコードする蛋白質は細胞外に分泌されて SSI 様のプロテアーゼ阻害活性を発揮する可能性が非常に高いと考えられた。また、 *sgiA* 周辺の遺伝子構成について図 2.1.3b-2 に示した。

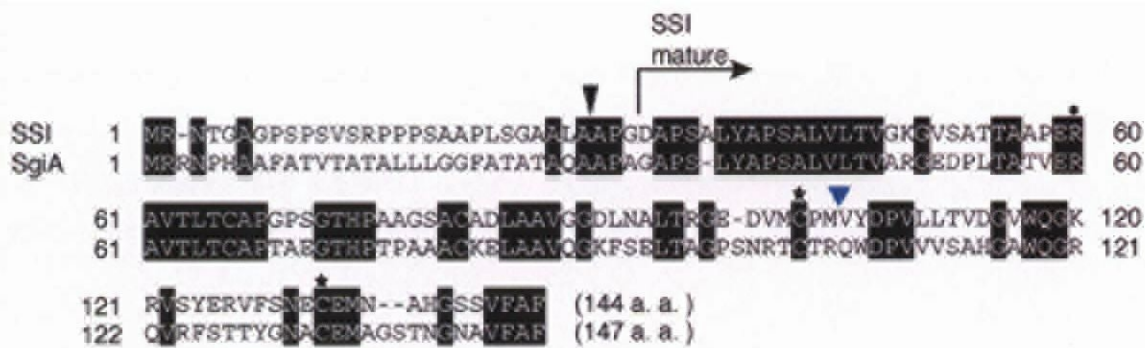


図 2.1.3b-1 *S. griseus* における SSI 様蛋白質のアミノ酸アラインメント

SSI (*S. albogriseolus* S-3253) と *S. griseus* IFO13350 ゲノム情報から見いだされた SSI 様蛋白質 SgiA のアミノ酸配列を比較した。●は C 末端との塩橋形成による構造維持に必要とされるアルギニン残基を示す。★はジスルフィド結合により構造を維持するのに必要なシステイン残基を示す。SSI の成熟型 (mature) 配列の N 末端は矢印で示した。▼で反応部位を示した。反応部位周辺のアミノ酸配列には多様性がある (Taguchi, 1995b)。Signal P プログラムにより予測された pre-pro 配列の境界を▼で示した (SSI と SgiA の境界は同じ位置である)。



図 2.1.3b-2 *sgiA* 周辺の遺伝子構成

周辺の遺伝子の位置と方向を矢印で示した。周辺の ORF がコードする蛋白質のホモロジーは、*orfA* : ABC transporter、*orfB* : possible-binding-protein dependent transport lipoprotein、*orf1* : putative export protein、*orf2* : ribosomal protein、*orf3* : hypothetical protein である。

sgiA は AdpA 依存的な転写を示す

ゲノム情報から *sgiA* という SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質をコードする ORF は見いだしたものの、情報は塩基配列のみであった。ここで「1.実際に発現しているのか?」「2.発現した蛋白質はプロテアーゼ阻害活性を持つのか?」といった、実際に生体内ではたらくための条件を満たさなければゲノムに遺伝子を見いだしても意味はない。そこでまず転写を調べることによって実際に発現しているかどうかを調べることにした。*sgmA* や *sprT*、*sprU* の転写を調べたときと同様、YMPD 固体培地で培養した野生株から RNA を抽出し、SI マッピング法により *sgiA* の転写を調べた (図 2.1.3b-3)。その結果、*sgiA* は培養を通じて非常に強い転写を示しているこ

とが明らかとなった。さらに、発現制御における A-ファクターカスケードと *sgiA* との関係にも興味を持たれたので、 $\Delta adpA$ 株についても *sgiA* の転写を調べた。驚くべきことに $\Delta adpA$ 株では *sgiA* の転写が消失しており、AdpA は分泌プロテアーゼのみならずプロテアーゼ阻害蛋白質をコードする遺伝子の転写をも制御している、ということが明らかになった。

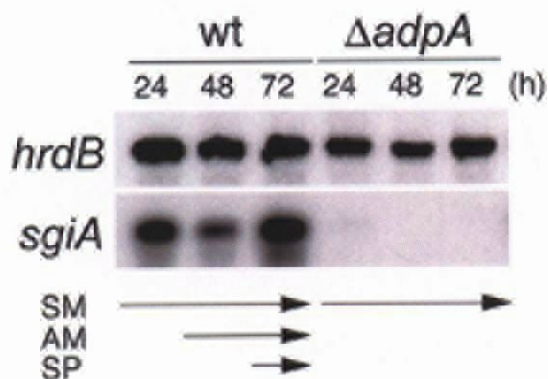
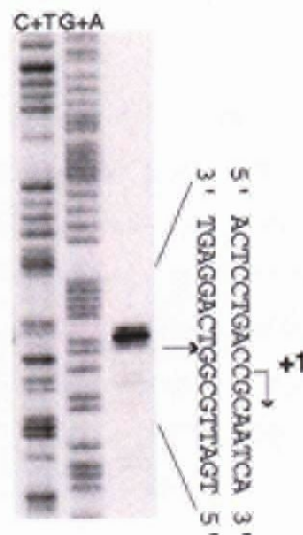


図 2.1.3b-3 SI マッピング法による *sgiA* の転写解析

YMPD 固体培地において野生株 (wt) および *adpA* 遺伝子破壊株 ($\Delta adpA$) を 28°C で培養した。24, 48, 72 時間で菌体を回収し、RNA を抽出、それぞれの遺伝子の転写量を比較した。*hrdB* は恒常的に発現するシグマ因子で RNA 量のコントロールである。SM: 基底菌糸、AM: 気中菌糸、SP: 胞子、を表す。

さらに、高解像度の SI マッピング法を行うことによって *sgiA* の転写開始点を決定した (図 2.1.3b-4)。転写開始点は開始コドンの 33 bp 上流に位置しており、プロモーターは 17 bp のスペーサーをもつ主要シグマ因子で認識されると考えられる配列であった。



```

-417 GGTGGGTCTTCTCGGTGAGGGCAGGAGCGATCACGACAGTAAGGTTAGC -368
-367 CTAGCCTAAATTGCCCTGGTCAAGCGGGATTCCGGAATCGTGTCTCTCCGCG -318
-317 TGACCCTCGGGGATCCGTCGCCCCGTCTCCCTCGCCGTCGAGGTGGTGA -268
-267 CGGCGGCTCTCCCGCCGGGGCGCGGATGCCCGGGCGGGCGTTTCTTCC -218
-217 GGCCGAAGCCGCAGAGCGGCGCATCGCCGACTTTCOGTGTATCCGCAGGT -168
-167 CAGGAGGTAGTTCTGCGTTGAAACCGCCGAGCTCCGTCCATATGCTGGACG -118
-117 CCTCACGCCGGGCGTCTGAGCTGCCCGAATGACCATTCCGGTCGGCTCGAA -68
-67 CGCCCGCCCGGGCTGGAAGGCGGCCGTGGCGTGCCTTACTTTCCGCA -18
-17 TGCCTAAGACTCCTGACCGCAATCAGGCATTGACCAAGGAGCCTCACCC +33
      -10      +1      -35
+34 ATGCGACGCAACCCTCACGCCGCCCTTCGCGACCGTCAAGGCGACCGCCCT +83
      M R R N P H A A F A T V T A T A
  
```

図 2.1.3b-4 高解像度 S1 マッピング法による *sgiA* の転写開始点決定

下にプロモーター周辺の塩基配列を示した。転写開始点を+1とし、-10および-35配列、翻訳されたN末端配列、およびAdpA結合部位と考えられる配列(後述)を示した。AdpA結合配列と考えられる部位は2カ所(site A、site B)があり、矢印で結合コンセンサス配列を示した。

AdpA は *sgiA* 上流に結合する

sgiA が AdpA 依存的な転写を示したことから、AdpA によって直接的に転写活性化を受けるのか、間接的に転写活性化を受けるのか、について興味を持たれた。そこで AdpA が *sgiA* 上流に結合するかどうかを、ゲルシフトアッセイにより調べた。直接転写活性化を受けるのであれば遺伝子上流に結合するはずである。probe S1 (-343~+104、転写開始点を+1 とする)、probe S2 (+58~+484)、probe S3 (-683~-299)、probe S4 (-43~+104)、probe S5 (-183~+104)、probe S6 (-340~-111)、probe S7 (-543~-258)、probe S8 (-683~-404) を作製し、AdpA との結合を調べると、probe S1、probe S3、probe S5、probe S7 に結合が見られた (図 2.1.3b-5)。結合が見られなかったプローブとの比較から、AdpA は-404~-340 の領域 (site B とする)、および-111~-43 の領域 (site A とする) の 2 カ所に結合すると推測された。この領域について図 2.1.3b-4 にも示しているが、この領域の中には AdpA 結合コンセンサス配列と相同な配列が見いだされていることから site A、site B は AdpA 結合部位であると考えられる。このことから、*sgiA* は AdpA が遺伝子上流に結合することによって直接転写活性化される可能性が高くなった。

一方で、*sgiA* の上流には逆向きの *orfA* が存在する。AdpA は遺伝子上流に結合することによって標的遺伝子の転写活性化を行うことから、特に site B への AdpA 結合は *orfA* の転写活性化に関与している可能性も十分に考えられる。そこで、S1 マッピング法によって *sgiA* の転写を調べた際と同様にして *orfA* の転写も調べた。しかし *orfA* の転写は検出することができず、検出のプローブを変える、多量の RNA を用いる等の工夫をしても検出することはできなかった。このため、AdpA 結合の *orfA* への関与は完全に否定はできないものの、そもそも転写が見られないことから関与の可能性は低いのではないかと考えている。

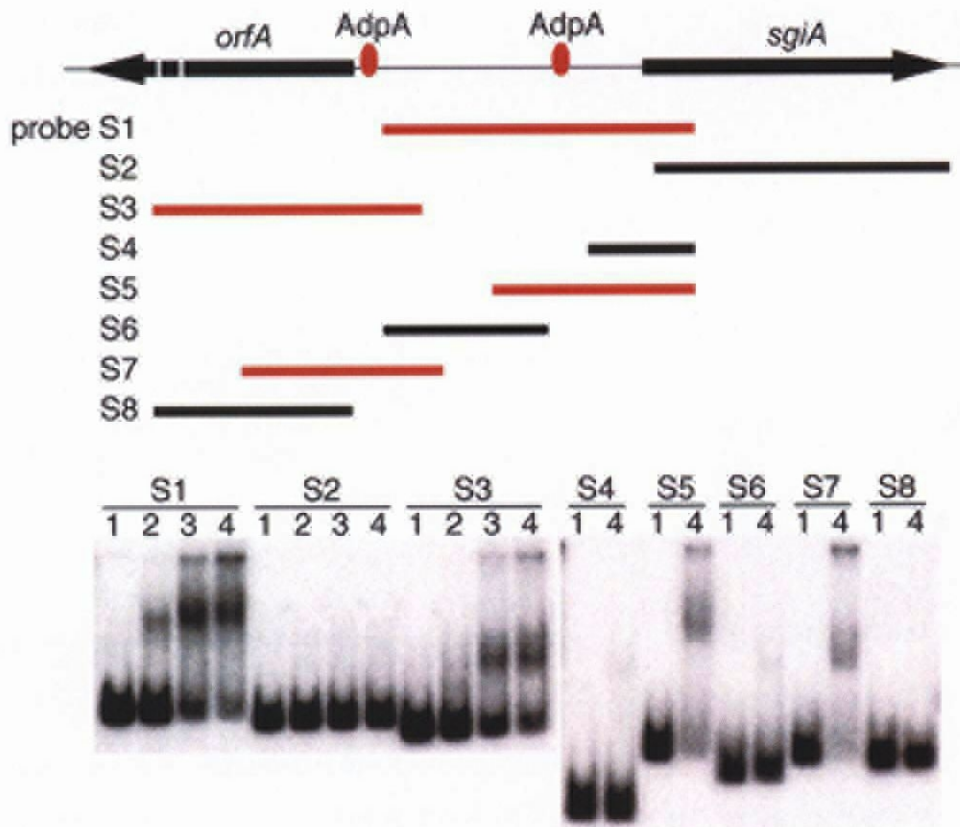


図 2.1.3b-5 ゲルシフトアッセイによる *sgiA* 上流への AdpA 結合解析

プローブの位置については、probe S1 (-343~+104、転写開始点を+1とする)、probe S2 (+58~+484)、probe S3 (-683~-299)、probe S4 (-43~+104)、probe S5 (-183~+104)、probe S6 (-340~-111)、probe S7 (-543~-258)、probe S8 (-683~-404)。加えた AdpA の量は、レーン 1 : 0 μ g、lane 2 : 0.2 μ g、lane 3 : 0.4 μ g、lane 4 : 0.8 μ g である。結合が見られたプローブは赤色で示した。

sgiA 遺伝子破壊株の作製

以上のように、*sgiA* は *AdpA* が関与して転写活性化されることで発現していることが明らかとなったが、*SgiA* は実際にプロテアーゼ阻害活性を持っているのか、そして最も興味を持っている生理的機能は何か、を調べる必要がある。これらを同時に調べるために、遺伝子破壊株を作製しその形質を調べることにした。*sgiA* の遺伝子破壊は薬剤耐性遺伝子で置換することにより行った (図 2.1.3b-6)。

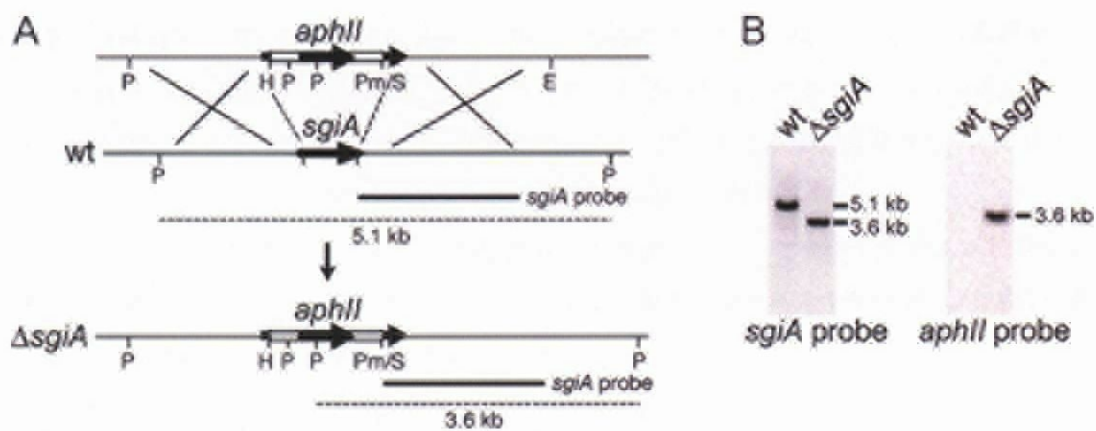


図 2.1.3b-6 *sgiA* 遺伝子破壊株の作製

(A)*sgiA* 遺伝子破壊のスキーム。制限酵素サイトは、E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PvuII*; Pm, *PmaCI*; S, *SmaI* で示した。(B)サザンプロットによる遺伝子破壊の確認。*EcoRI-PvuII* で制限酵素処理した染色体に対して *sgiA* プロブ、*aphII* プロブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

まず、野生株と $\Delta sgiA$ 株のプロテアーゼ活性を比較することにより *sgiA* がプロテアーゼ活性阻害を担っているかどうかを調べた。スキムミルクを添加した培地でそれぞれの株を培養し、スキムミルクの分解をプロテアーゼ活性として検出した(図 2.1.3b-7)。その結果、野生株と $\Delta sgiA$ 株ではスキムミルクの分解によるハロの大きさに小さいながら差が見られた。*S. coelicolor* A3(2)の場合は長く培養を続けても親株と $\Delta SCO0762$ のまわりのハロの大きさの差は顕著であったが、これとは異なり、*S. griseus* ではスキムミルクの分解に差がみられるのは培養 48 時間程度までであり、その後は野生株も大量にスキムミルクを分解して大きなハロがみられた。以上から、*S. coelicolor* A3(2)とはプロテアーゼ活性に対する寄与の程度は異なるものの、*SgiA* は SSI 様プロテアーゼ阻害蛋白質としての活性を持っていると言ってよいと考えられる(その後の解析で合成基質を用いた測定では *SgiA* の明らかな阻害活性を見いだしている、討論参照)。

また、*sgiA* 遺伝子破壊の相補は低コピーベクターを用いて行ったものの、*S. coelicolor* A3(2)の場合と同様にうまく機能しなかった (data not shown)。プラスミド上では発現しにくいのか、わずかなコピー数の違いが分泌に影響しているのか、原因は不明である。

形態分化については野生株と $\Delta sgiA$ 株を様々な培養条件について比較しているが、今のところ差が見られない。また、ストレプトマイシン生産や黄色色素生産といった二次代謝には影響がないことは確認している。



図 2.1.3b-7 *sgiA* 遺伝子破壊株のプロテアーゼアッセイ

野生株と $\Delta sgiA$ 株を、スキムミルクを 0.7% 添加した Bennett 培地で 28°C、48 時間培養し撮影した。プロテアーゼ活性をスキムミルクの分解によりできるハロによって検出した。

2.1.3b-III 討論

以上のように、*S. griseus* IFO13350にもSSI様プロテアーゼ阻害蛋白質をコードする遺伝子 *sgiA* があることを発見し、解析を行った。SSI ファミリー蛋白質は多数の *Streptomyces* から見つまっている一方で、SSI ファミリー蛋白質を持っているか否か不明なものもある。*S. griseus* においてはゲノム解析の進行が SSI ファミリー蛋白質の同定の助けとなった。様々な生物種のゲノム解析が進行している今、*Streptomyces* も例外でなく徐々にそのゲノム情報量は増加している。ゲノム解析の進行によって他の *Streptomyces* でもさらに SSI ファミリー蛋白質をコードする遺伝子は見いだされてくるであろう。

sgiA については本研究の解析ではまだ途中段階であり、現在は醗酵学研究室の平野によって解析が続けられている。

本研究の解析では、*sgiA* が実際に発現してプロテアーゼ活性の調節を行っていることを明らかにし、さらに *sgiA* は AdpA 依存的な転写を示しかつ遺伝子上流に AdpA が結合することも明らかにした。AdpA 結合位置は 2 カ所であることがわかったが、特に site A は *sgiA* プロモーターのすぐ上流に位置する。*sgmA* 以後、現在までに AdpA が結合することで直接転写が活性化されることを証明された標的遺伝子 (*sgmA*、*sprT*、*sprU*、*strR*、*sprA*、*sprB*、*sprD*、*ssgA*、*amfR*) は、いずれもそのプロモーターのすぐ上流に AdpA 結合部位を持つ(本研究および、Tomono *et al.*, 2005a; Tomono *et al.*, 2005b; Yamazaki *et al.*, 2003a; Yamazaki *et al.*, 2003b)。そして AdpA 結合部位を複数持つ場合でもプロモーターのすぐ上流の結合部位は転写活性化に必須であることが証明されている。したがって、site A への AdpA 結合が *sgiA* の直接的な転写活性化を担っている可能性が高い。

しかしながら、SCO0762 の場合もそうであったが、*sgiA* は非常に強い転写を示す。一般的なプロモーター配列を持ちながら AdpA による転写活性化が異常に強いというのは他の標的遺伝子では見られない例であり、そのメカニズムには興味を持たれる。SCO0762 も *S. coelicolor* A3(2) における AdpA ホモログ、AdpAc/BldH によって転写制御を受けることが示され (Kim *et al.*, 2005)、そのメカニズムも共通であることが予想される。

SgiA のプロテアーゼ阻害活性については、スキムミルクプレートを用いたアッセイにおいて遺伝子破壊株の野生株との比較で調べたが、その活性は小さなものであった。*S. griseus* は多量の分泌プロテアーゼを生産することで知られており、強すぎるプロテアーゼ活性がこの系での検出を難しくしているのかもしれない。一方、醗酵学研究室のその後の解析で合成基質を用いたプロテアーゼ活性測定も行っているが、ここではより明白な差を検出することができている。また、大腸菌で発現・精製した SgiA を用いて *in vitro* でもプロテアーゼ阻害活性を調べているが、こちらも阻害活性を検出している。以上からも、SgiA は SSI ファミリーの 1 つと言うこと

ができるだろう。

sgiA の生理的機能についてもさらに様々な条件で、また大腸菌で発現精製した **SgiA** も利用しながら解析が続けられている。現在のところ、期待していた形態分化への寄与について明らかな結果は得られていないものの、分泌プロテアーゼの発現を制御している **AdpA** により同じく制御を受けているプロテアーゼ阻害蛋白質のその生理的意義は、非常に興味深い。

2.1.3b-IV 材料と方法

以下、特に記載のないものはこれまで述べた実験と同様の材料・方法である。以下の記述で名前のみ記したプライマーの位置、配列等については表 2.1.3b-1 にまとめた。

S1 マッピング法による *sgiA* の転写解析

RNA 抽出法、および S1 マッピング法は前章までと同じ方法である。*hrdB* の転写は 5'-TCGATGAGCGCCATCACAGACTCG-3' (+193 to +170) と 5'-TCGGCCCATTTTCGTCACGTATGAG-3'* (-121 to -98) の組み合わせ (*のプライマーを ³²P ラベルした)、*sgiA* の転写は *sgiA*-F8 と *sgiA*-R7*のプライマーの組み合わせにより作製した。高解像度の S1 マッピング法による転写開始点決定でも同じプライマーの組み合わせを用いた。

ゲルシフトアッセイ法による *sgiA* 上流への *AdpA* 結合解析

AdpA の調製方法、プローブの作製方法、反応条件などは前章までと同様である。プローブ作製に用いたプライマーの組み合わせについて記述する。

probe S1 : *sgiA*-F1+*sgiA*-R1、probe S2 : *sgiA*-F2+*sgiA*-R2、probe S3 : *sgiA*-F3+*sgiA*-R3、probe S4 : *sgiA*-F7+*sgiA*-R1、probe S5 : *sgiA*-F6+*sgiA*-R1、probe S6 : *sgiA*-F4+*sgiA*-R5、probe S7 : *sgiA*-F5+*sgiA*-R6、probe S8 : *sgiA*-F3+*sgiA*-R4

sgiA 遺伝子破壊株の作製

薬剤耐性遺伝子を挿入することによって *sgiA* を破壊した。図 2.1.3b-6 も参照。*SgiA* 全 147 アミノ酸中、Arg-2 から Ala-143 にあたる塩基配列をカナマイシン耐性遺伝子で置換した。破壊用プラスミドの構築について以下に記す。

sgiA の上流および下流それぞれ約 1.9 kb を PCR により取得した。*S. griseus* IFO13350 の染色体を鋳型としてプライマー-dgSSI-RF (5'- CCCAAGCTT CATGGGTGAGGCTCCTTGGTC -3'、下線は *HindIII* サイトを示す) と dgSSI-RR (5'-CTTGCCGATGAGTTCGACGG-3') を用いて *sgiA* 上流を PCR により増幅し、得られた断片を *HindIII*-*Sall* で pUC19 にクローニングした。DNA シーケンスにより PCR エラーがないことを確認した。同様に下流配列をプライマー-dgSSI-LF (5'- CCGGAATTCGACCATGGACCCATGGGCAGAGAATCCCCC-3'、下線は *EcoRI* サイトを示す) と dgSSI-LR (5'- CCCAAGCTT CACGTGGTTCGCCTTCTGACCCACCGGGGCG CG-3'、下線は順に *HindIII*、*PmaCI* サイトを示す) を用いて増幅し、*EcoRI*-*HindIII* で pUC19 にクローニングした。以上により得た、下流配列をクローニングしたプラスミドから下流配列を *EcoRI*-*PmaCI* 断片として切り出し、Tn5 から *SmaI*-*HindIII* で切り出したカナマイシン耐性遺伝子を含

む断片をつないだ形で 3 断片ライゲーションにより pUC19 の *EcoRI-HindIII* サイトにクローニングした。さらにこのプラスミドから *EcoRI-HindIII* として切り出した断片と、上流配列をクローニングしたプラスミドから *HindIII-XbaI* として切り出した上流配列断片をつないだ形で 3 断片ライゲーションにより pUC19 の *EcoRI-XbaI* サイトにクローニングし、破壊用プラスミドを完成させた。このプラスミドを *E. coli* JM110 株により大量調製し、*DraI* で切断して線状にした後、0.1 M NaOH でアルカリ変性—中和を施し、*S. griseus* IFO13350 に形質転換した。破壊株は染色体を抽出してサザンハイブリダイゼーションを行うことで確認した。

表 2.1.3b-1 使用したプライマー

Primer	Positions	Sequence (5' to 3')
sgiA-F1	-343 to -324	CGGGATTTCGGAATCGTGTCC
sgiA-R1	+104 to +85	GTGGCGAATCCACCGAGCAG
sgiA-F2	+58 to +77	TTCGCGACCGTCACGGCGAC
sgiA-R2	+484 to +465	CGGTGGGTCAGAAGGCGAAC
sgiA-F3	-683 to -664	CGGTGCGGGCCTTGTGCAGC
sgiA-R3	-299 to -318	GACGGATCCCCGAGGGTCAC
sgiA-F4	-340 to -321	GATTTCGGAATCGTGTCTCC
sgiA-R4	-404 to -423	CGAGAAGACCCACCGCCGCG
sgiA-F5	-543 to -524	ATCGTCATGTCGCGGGCGTC
sgiA-R5	-111 to -130	CGTGAGGCGTCCAGCATATG
sgiA-F6	-183 to -164	CCGTGTATCCGCAGGTCAGG
sgiA-R6	-258 to -277	AGAGCCGCCGTCACCACCTC
sgiA-F7	-43 to -24	CCGTCGGCGTGCCTTACTT
sgiA-R7	+76 to +57	TCGCCGTGACGGTCGCGAAG
sgiA-F8	-127 to -108	ATGCTGGACGCCTCACGCCG